

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657125

研究課題名(和文)リサイクリングエンドソームからリソソームへの新規分解経路の同定とその機能解明

研究課題名(英文)Study on the novel degradation pathway from recycling endosomes to lysosomes

研究代表者

福田 光則 (Fukuda, Mitsunori)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：50311361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量G蛋白質Rab12はリサイクリングエンドソームからリソソームへの新規輸送経路に関与することが示唆されているが、その生理学的意義は明らかではなかった。本研究課題では、Rab12依存的に分解されるリサイクル分子として、アミノ酸トランスポーターPAT4を同定することに成功した。PAT4は細胞外からのアミノ酸流入に関与するため、Rab12の機能不全により細胞膜上のPAT4量が増大すると、それに伴い細胞内アミノ酸量が増加し、mTORC1の活性化とオートファジーの抑制が引き起こされる。すなわち、Rab12は細胞膜上のPAT4量を適切に保つことにより細胞の異常増殖を抑える機能を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Small GTPase Rab12 has recently been suggested to regulate a new membrane traffic pathway from recycling endosomes to lysosomes to degrade recycling molecules, but its physiological significance remained unknown. In this study, we found that Rab12 promotes constitutive degradation of PAT4 (proton-coupled amino-acid transporter 4). Because PAT4 is involved in the uptake of amino acids from the extracellular medium, knockdown of Rab12 in MEF cells increased the intracellular concentration of L-amino acids, resulting in the activation of mTORC1 and inhibition of autophagy. Our findings suggest that Rab12 suppresses excessive cell growth by maintaining the proper amount of PAT4 at the plasma membrane.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：リサイクリングエンドソーム リソソーム 蛋白質分解 トランスフェリン受容体 アミノ酸トランスポーター Rab 低分子量G蛋白質 膜輸送

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上の受容体分子は、リガンドを結合すると細胞内に取り込まれ、やがてリソソームで分解されるが、トランスフェリン受容体や一部のアミノ酸トランスポーターなどはリサイクリングエンドソームを経由して細胞膜へとリサイクルされる。しかし、同じ蛋白質分子が永遠に使い続けられるとは考え難く、何らかの品質管理機構が存在すると想定されるが、これまでリサイクルされる蛋白質分子の分解に関する知見はほとんどなかった。当研究室では最近、トランスフェリン受容体の恒常的分解過程に低分子量 G 蛋白質 Rab12 が関与すること、Rab12 により制御されるリサイクリングエンドソームからリソソームへの新規輸送経路が存在する可能性を初めて示唆した (Traffic, 2011;12:1432-1443)。しかし、これまでこの経路によるリサイクル蛋白質の分解の生理学的意義は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々が見出したリサイクリングエンドソームからリソソームへの輸送経路を確立すると共に、リサイクルされる蛋白質の分解の生理学的意義の解明を目的とした。具体的には、Rab12 依存的に分解される細胞膜蛋白質としてアミノ酸トランスポーターに着目し、その分解制御による細胞増殖・オートファジー (自食) との関連性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) において特異的な siRNA を用いて内在性の Rab12 分子をノックダウンし、細胞機能 (細胞増殖のシグナル及びオートファジー) への影響を検討した。具体的には、細胞増殖において中心的な役割を果たす mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) キナーゼ複合体の活性化状態 (p70S6 キナーゼのリン酸化) 及び LC3 の細胞内ドット数 (オートファジー活性化の指標) を定量した。

(2) リサイクリングエンドソームに局在するアミノ酸トランスポーターを同定するため、リサイクリングエンドソームのマーカーであるトランスフェリン受容体及び Rab12 と共局在するアミノ酸トランスポーターを免疫組織化学的手法によりスクリーニングした。

(3) 候補アミノ酸トランスポーターの Rab12 による分解制御を生化学的に解析すると共に、ノックダウンによる mTORC1 複合体の活性化やオートファジーへの影響を細胞レベルで検討した。

4. 研究成果

(1) Rab12 ノックダウン細胞においては、mTORC1 複合体が活性化されており (p70S6

キナーゼのリン酸化状態の亢進)、結果的にオートファジーが顕著に抑制 (LC3 の細胞内ドット数の減少) されることが明らかとなった。種々の解析の結果、mTORC1 複合体の活性化はアミノ酸シグナルと関連があることが示唆された (図 1)。

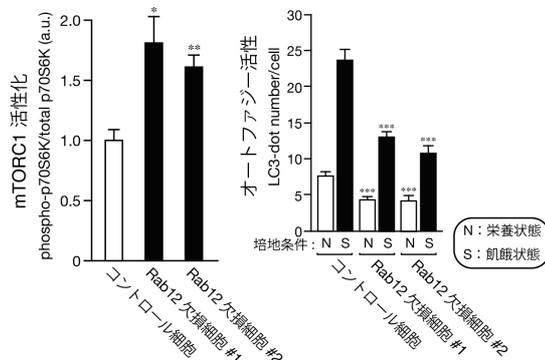


図 1 Rab12 ノックダウン MEF 細胞における mTORC1 の活性化 (左) とオートファジーの抑制 (右)

(2) (1) の結果を受け、我々は Rab12 が細胞内へのアミノ酸の取り込みを行なうアミノ酸トランスポーターの分解制御に関わるのではないかと考え、免疫組織化学的手法に基づくスクリーニングを行なった結果、リサイクリングエンドソームに主に局在するアミノ酸トランスポーターとして PAT4 (proton-coupled amino acid transporter 4) を同定することに成功した。PAT4 は定常状態では主にリサイクリングエンドソームに局在するが、細胞膜と行き来しており、さらにその一部は Rab12 依存的にリソソームで恒常的に分解を受けることを見出した。

(3) Rab12 をノックダウンした MEF 細胞では、PAT4 の分解が抑制されるため、細胞膜上のアミノ酸トランスポーター量が増加すると共に、細胞内アミノ酸量が増大することが明らかとなった (図 2)。その結果、細胞増殖において中心的な役割を果たす mTORC1 の

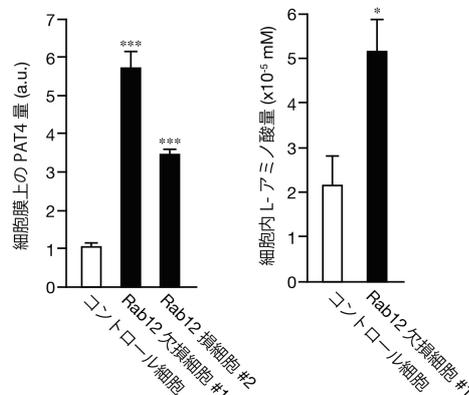


図 2 Rab12 ノックダウン MEF 細胞における細胞膜上の PAT4 量の増大 (左) と細胞内アミノ酸量の増加 (右)

過剰な活性化とオートファジーの抑制が引き起こされることを突き止めた。

以上の結果から、Rab12 は細胞膜とリサイクリングエンドソームを行き来するアミノ酸トランスポーターPAT4 の一部を、リサイクリングエンドソームからリソソームへと輸送し、分解する役割を担っていることが明らかとなった (図3上)。Rab12 のノックダウンや機能不全により、PAT4 の分解が抑制されると、細胞膜上には PAT4 が蓄積するため、細胞膜上に蓄積した PAT4 からは細胞内にアミノ酸が流入する。増加したアミノ酸は mTORC1 の過剰な活性化を引き起こし、結果的に細胞内の異物除去に重要な役割を果たすオートファジーの誘導が阻害されると考えられた (図3下)。

mTORC1 は細胞増殖において中心的な役割を果たすため、がん抑制のターゲットとしても注目されている分子である。また、mTORC1 の活性化により阻害されるオートファジーに関して、オートファジー活性の阻害によりがん・腫瘍が誘発されることが知られている。さらに、様々ながん細胞でアミノ酸トランスポーターPAT4 の発現量が増大していることが最近報告されていることから、今後、PAT4 分子やその輸送に関わる Rab12 をターゲットとしたがん・腫瘍抑制の創薬への応用も将来的に期待される。

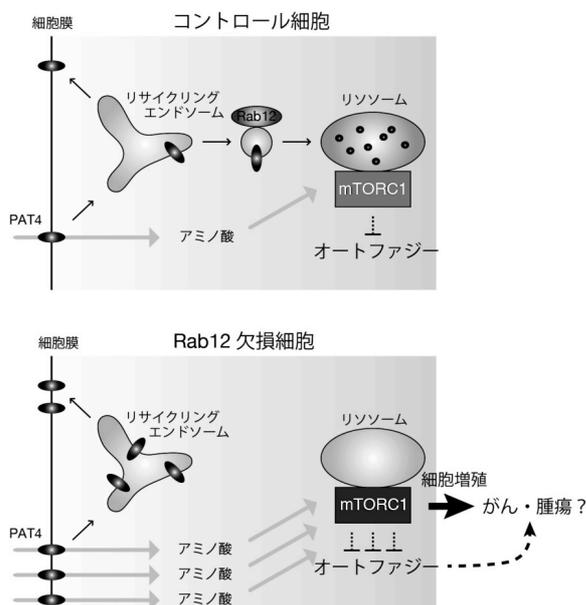


図3 正常MEF細胞（上）及びRab12ノックダウン細胞（下）におけるPAT4分解と細胞内シグナル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6件)

① Matsui, T. & Fukuda, M. (2014) Methods of analysis of the membrane trafficking pathway from recycling endosomes to lysosomes.

Methods Enzymol. 534, 195-206 (査読あり)
doi: 10.1016/B978-0-12-397926-1.00011-1

② Yasuda, T. & Fukuda, M. (2014) Slp2-a controls renal epithelial cell size through regulation of Rap-ezrin signaling independently of Rab27. *J. Cell Sci.* 127, 557-570 (査読あり)
doi: 10.1242/jcs.134056

③ Fukuda, M. (2013) Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic* 14, 949-963 (査読あり)
doi: 10.1111/tra.12083

④ Matsui, T. & Fukuda, M. (2013) Rab12 regulates mTORC1 activity and autophagy through controlling the degradation of amino-acid transporter PAT4. *EMBO Rep.* 14, 450-457 (査読あり)
doi: 10.1038/embor.2013.32

⑤ Matsui, T., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2012) The Rab interacting lysosomal protein (RILP) homology domain functions as a novel effector domain for small GTPase Rab36: Rab36 regulates retrograde melanosome transport in melanocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 28619-28631 (査読あり)
doi: 10.1074/jbc.M112.370544

⑥ 松井貴英、福田光則：“トランスフェリン受容体の恒常的分解を制御する低分子量GTPase Rab12”, *生体の科学*, 63(5), 512-513 (2012) (査読無し)
URL: <http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=34660>

〔学会発表〕 (計 8件)

① 松井貴英、福田光則
アミノ酸トランスポーターの分解を介した新規栄養シグナルとオートファジーの制御機構
第119回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム「オルガネラの恒常性維持機構～疾患を見据えた細胞生物学的アプローチ～」(栃木) 2014年3月27日

② 松井貴英、福田光則
Rab12はアミノ酸トランスポーターPAT4の分解制御を介してmTORC1とオートファジーを制御する
第7回オートファジー研究会(掛川) 2013年12月19日

③ 野口憲太、松井貴英、福田光則
Dennd3はRab12の活性化を介してmTORC1活性及びオートファジーを調節する
第36回日本分子生物学会年会(神戸) 2013

年 12 月 3 日

④ 福田光則

低分子量 GTPase Rab12 によるリサイクリングエンドソームからリソソームへの新規分解経路の制御機構
第 65 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「タンパク質分解システムによる細胞制御」(名古屋) 2013 年 6 月 21 日

⑤ 松井貴英、福田光則

Rab12 はアミノ酸トランスポーターPAT4 の分解制御を介して mTORC1 とオートファジーを制御する
第 65 回日本細胞生物学会大会 (名古屋) 2013 年 6 月 20 日

⑥ 福田光則

低分子量 GTPase Rab が司る多彩な生命現象～メラニン輸送、神経細胞の極性輸送からオートファジーまで～
理化学研究所・細胞システムコロキウム (埼玉) 2012 年 12 月 7 日

⑦ Takahide Matsui & Mitsunori Fukuda

Small GTPase Rab12 regulates constitutive degradation of transferrin receptor.
Cold Spring Harbor Asia Conference “Small GTPase different scales: proteins, membranes, cells” (Suzhou, China) September 25, 2102

⑧ 松井貴英、大林典彦、福田光則

Rab36 は RILP との結合を介してメラノソームの逆行性微小管輸送を制御する
第 4 回新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」班会議 (秋保) 2012 年 6 月 13-14 日

[その他]

東北大学・生命科学研究所・膜輸送機構解析分野・ホームページ
http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/t_fukuda/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 光則 (FUKUDA MITSUNORI)
東北大学・生命科学研究所・教授
研究者番号: 50311361

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし